

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06296595 A**(43) Date of publication of application: **25.10.94**

(51) Int. Cl.

A61B 5/0408
A61B 5/0492
A61B 5/0478
// H01B 5/14

(21) Application number: **05090291**(22) Date of filing: **16.04.93**(71) Applicant: **MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD**

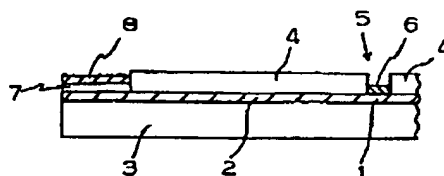
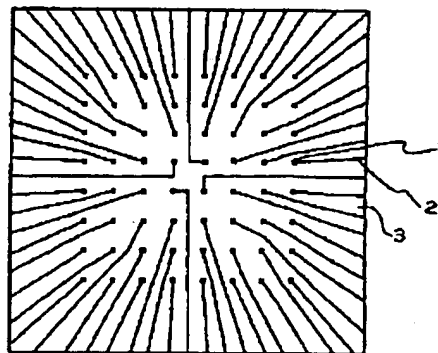
(72) Inventor: **SUGIHARA HIROKAZU**
TAKEYA MAKOTO
MITSUMATA TADAYASU

(54) **UNIFIED COMPLEX ELECTRODE**

(57) Abstract:

PURPOSE: To make it possible to cultivate neurocytes and to realize simultaneous multipoints measurement of electric activity of the neurocytes by forming the unified complex electrode to have the specific area of electrode and the specific surface resistance of electrode part.

CONSTITUTION: This unified complex electrode has the plural number of electrodes 1 that have mutually the same interval between the nearest electrodes on the insulated board 3, and the wiring part is formed by wiring lead line 2 from electrode 1 nearly radially. The insulating layer 4 covering the lead line 2 is formed, the electrode area is set as $3 \times 2 \mu\text{m}$ and $24 \times 10^4 \mu\text{m}$, and the surface resistance of the electrode part is set as $210 \Omega/\text{cm}^2$. In the unified complex electrode, distance between the nearest electrodes is set as $310 \mu\text{m}$ and $21000 \mu\text{m}$. In addition, the insulating layer 4 covering the lead line 2 has a dent in each electrode, and is formed on almost all the surface of the insulating board 3 except the region near to the contact point of lead line 2 with their outer circuit. In addition, the plural number of electrode centers are set at each crossing point of the grid that is composed of 8×8 .



COPYRIGHT: (C)1994,JPO

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-296595

(43)公開日 平成6年(1994)10月25日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
A 6 1 B	5/0408			
	5/0492			
	5/0478			
		7638-4C	A 6 1 B 5/ 04	3 0 0 E
		7638-4C		3 0 0 N
審査請求 未請求 請求項の数 4 OL (全 7 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平5-90291

(22)出願日 平成5年(1993)4月16日

(71)出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72)発明者 杉原 宏和

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72)発明者 竹谷 誠

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72)発明者 光亦 忠泰

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

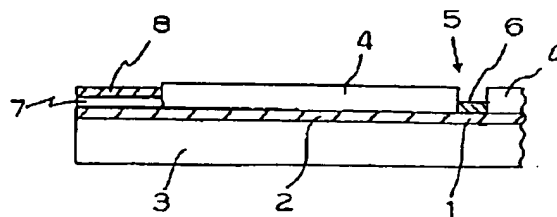
(74)代理人 弁理士 池内 寛幸 (外1名)

(54)【発明の名称】 一体化複合電極

(57)【要約】

【目的】 神経細胞の多点同時刺激・記録を長期にわたり行うことができ、応答性の優れた一体化複合電極を提供する。

【構成】 硬質ガラスの絶縁基盤3上の全面にITO膜を蒸着し、8×8の格子状の各交点に各電極1の中心部が位置し、各電極の最近接の電極の中心間距離が等しく、しかもリード線2が放射状に伸びた形状にITO膜をエッチングする。ついで、絶縁層4としてネガティブフォトセンシティブポリイミドをスピコートし、各電極の中心に一边50μmの正方形の孔5ができるように、絶縁層パターンを露光形成する。さらに、各電極の露出部分(すなわち1辺50μmの正方形の内部)に、膜厚500オングストロームとなるように金6を蒸着する。リード線2の電極1と反対方向の端部近傍の部分の外部回路との接点は、金7およびニッケル8でコートする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 絶縁基盤上に、最近接の電極間距離が相等しい複数個の電極を備え、前記電極からリード線を略放射状に配設した配線部と、前記リード線をカバーする絶縁層とを設け、かつ電極面積が $3 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ 以上 $4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 以下の範囲であり、電極部の表面抵抗が $10 \Omega/\text{cm}^2$ 以下である一体化複合電極。

【請求項2】 最近接の電極間距離が、 $10 \mu\text{m}$ 以上 $1000 \mu\text{m}$ 以下の範囲である請求項1に記載の一体化複合電極。

【請求項3】 リード線をカバーする絶縁層が、各電極上に孔を有し、かつリード線の外部回路との接点近傍を除いて前記絶縁基盤のほぼ全面に設けられた絶縁層である請求項1または2に記載の一体化複合電極。

【請求項4】 複数個の電極中心部が、 8×8 の格子上の各交点に位置する請求項1～3のいずれかに記載の一体化複合電極。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生体活動の電気的計測、特に神経細胞の電気的活動を計測する神経生理の分野で用いる、多電極を有する一体化複合電極に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、神経細胞の医学的検討や電気素子としての適用の可能性の検討などが活発に行われてきている。神経細胞が活動する際には、活動電位が発生する。活動電位は、神経細胞のイオン透過性の変化に伴い、細胞膜内外のイオン濃度が変わることにより生じるものである。そして電極により、神経細胞近傍のイオン濃度変化（すなわちイオン電流）に伴う電位変化を測定することによって、神経活動の検出、検討が行われている。

【0003】従来、神経細胞の電気的活動を計測するには、ガラス電極等からなる記録電極と、金属電極等からなる刺激電極とを各々細胞内または細胞間に挿入し、刺激電極より刺激電流（または電圧）を印加した際の、神経細胞の電気的活動を記録電極により計測するのが普通であった。

【0004】これ以外にも、例えば細胞体を細管状のガラス吸引電極で突き刺し、細胞体の内部をガラス吸引電極中の液で還流し、このガラス吸引電極から電気信号を与えて細胞膜の電気的特性を観察するいわゆるパッチクランプ法等多数の変法がある。

【0005】さらには、絶縁性の基盤上にITO（酸化インジウム錫）等の導電性物質で直径 $15 \sim 20 \mu\text{m}$ の電極を形成し、この上で神経細胞を培養することにより、細胞に電極を刺入する事なく、細胞に電気的刺激を印加し、また神経細胞の電気的活動を記録する方法についても本発明者らが別途提案している。

【0006】また、この改良法として、電極の直径を2

$0 \sim 200 \mu\text{m}$ とすれば、神経細胞に定電流刺激を印加した際に電極間に発生する電位差が小さくなり、この結果ITOの破壊が起こりにくく、より長期にわたる観察が可能となることも本発明者らが別途提案している。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上述した従来の技術およびその変法においては、ガラス電極など、細胞に比べてかなりの大きさにならざるを得ない電極を用いるので、おもに空間的な制約と操作精度上の制約で、1つのサンプル中に一度に2本以上の記録電極を挿入し、神経細胞の電気的活動を記録する多点同時計測は非常に困難であるという課題があった。

【0008】神経回路網全体の働きを検討するためには、多くの神経細胞の活動を同時に記録する必要がある、測定点が増えるにしたがって、困難さの度合が増加し、多細胞間の観察ができ難いという課題があった。

【0009】さらには、ガラス・金属等の電極を細胞内または細胞間に刺入する必要があるために、細胞に与える損傷が大きく、数時間以上の長時間にわたる測定ができ難いという課題があった。

【0010】一方、絶縁性の基盤上にITO等の導電性物質で直径（または1辺） $15 \sim 20 \mu\text{m}$ の円形（または正方形）の電極を形成したものをを用いれば、多細胞間にわたる信号伝達の観察が可能となる。しかしながら、電極面積が $177 \mu\text{m}^2 \sim 400 \mu\text{m}^2$ と小さいため、培養液界面での電極抵抗は数 $\text{M}\Omega$ となり、通常刺激は定電流で与えられるので、電気抵抗が大きいと電極間にはきわめて大きな電位差が発生することになり、かかる大きな電圧で長期にわたり電気刺激を与えるとITOの破壊がおき、このため長期にわたる観察が困難であるという問題点があった。

【0011】また、電極面積を $300 \mu\text{m}^2 \sim 4000 \mu\text{m}^2$ にすれば、培養液界面での電極抵抗が小さくなるため、電極間に発生する電位差は比較的小さなものとなる。長期にわたり刺激電流を加えてもITOの破壊は、顕微鏡的には認められなかった。しかしながら、ある電極から刺激電流を印加し、他の電極で刺激に伴う電位変化を記録した際、長期刺激の前後で記録波形に大きな変化がみられた。すなわち長期刺激後では、刺激電流印加が記録波形に及ぼす影響（すなわちアーチファクト）が、長期刺激前より大きくなった。波形変化の原因は、電極表面が分極することによると考えられる。最悪の場合、神経細胞の電気的活動はアーチファクトに隠れ測定不可能となった。また、アーチファクトがそれほど大きくならない場合でも、長期刺激前後で神経活動強度を比較することが困難となるという問題点があった。

【0012】本発明は、かかる従来の問題点を解決し、神経細胞などの多点同時刺激・計測を簡便に行い、多細胞間にわたる信号伝達観察を数時間以上にわたり可能とし、かつ刺激電流印加に伴うアーチファクトの発生を抑

え、長期刺激の前後にわたり電位記録波形の比較を可能ならしめる一体化複合電極を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するため、本発明の一体化複合電極は、絶縁基盤上に、最近接の電極間距離が相等しい複数個の電極を備え、前記電極からリード線を略放射状に配設した配線部と、前記リード線をカバーする絶縁層とを設け、かつ電極面積が $3 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ 以上 $4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 以下の範囲であり、電極部の表面抵抗が $10 \Omega/\text{cm}^2$ 以下である構成を有する。

【0014】前記本発明の一体化複合電極においては、最近接の電極間距離が、 $10 \mu\text{m}$ 以上 $1000 \mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。また、前記本発明の一体化複合電極においては、リード線をカバーする絶縁層が、各電極上に孔を有し、かつリード線の外部回路との接点近傍を除いて前記絶縁基盤のほぼ全面に設けられた絶縁層であることが好ましい。

【0015】また、前記本発明の一体化複合電極においては、複数個の電極中心部が、 8×8 の格子上の各交点に位置することが好ましい。

【0016】

【作用】本発明の一体化複合電極は、絶縁基盤上に、最近接の電極間距離が相等しい複数個の電極を備え、前記電極からリード線を略放射状に配設した配線部と、前記リード線をカバーする絶縁層とを設け、かつ電極面積が $3 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ 以上 $4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 以下の範囲であり、電極部の表面抵抗が $10 \Omega/\text{cm}^2$ 以下であるので、本発明の一体化複合電極上に培養した神経細胞に信号を与え、同時に細胞間の信号の伝達を計測する際に、最近接の電極間距離を測定対象の神経細胞（すなわち細胞体と樹状突起と軸索突起）の長さとはほぼ等しく調整し、しかもこの電極を等間隔で並ばせることにより、一細胞体が電極上に配置し、この細胞体から伸びた細胞突起を介した細胞体が、隣合う電極上に位置する確率が高くなる。したがって、隣合う細胞体間の信号の伝達を検知できる。

【0017】しかも、電極から伸ばしたリード線を略放射状に配置したので、例えばリード線を平行に配置した場合に比べて、リード線間の容量成分（キャパシタンス）が少なくなり、電気信号であるパルス信号波形の崩れを小さくでき、回路の時定数が小さくなるため、早いパルス信号に対する応答性が向上し、神経細胞活動の早い成分に対する追従性が向上する。

【0018】さらに、電極面積を $3 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ 以上 $4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 以下の範囲で調整することにより、数時間以上の長時間にわたり細胞に電気刺激を与え、かつ細胞の電気的活動を測定することができる。

【0019】また、電極部の表面抵抗が $10 \Omega/\text{cm}^2$

以下であるため、ある電極で神経細胞に長期に刺激電流を印加し、他の電極で刺激電流に応じた神経細胞の電気的活動（電位変化）を記録する際に、刺激電極表面の分極が起こり難いため、刺激電流が電位記録波形に及ぼす影響（すなわちアーチファクト）が小さくなる。特に、長期に刺激電流を印加した後もアーチファクトが小さく、かつ形態の変化が無いため、長期刺激前後での神経細胞の電気的活動を比較することができる。

【0020】また、前記本発明の一体化複合電極において、最近接の電極間距離が、 $10 \mu\text{m}$ 以上 $1000 \mu\text{m}$ 以下である好ましい態様とすることにより、一般的に神経細胞の神経突起の長さがこの範囲内であるので、細胞体が電極上に位置し、かつ神経突起を介して結合する可能性が高く、神経細胞の測定に好都合な電極間距離となる。

【0021】また、前記本発明の一体化複合電極において、リード線をカバーする絶縁層が、各電極上に孔を有し、かつリード線の外部回路との接点近傍を除いて前記絶縁層基盤のほぼ全面に設けられた絶縁層である好ましい態様とすることにより、絶縁層をリード線上のみに選択的に設ける場合に比べ、感光性樹脂からなる絶縁性材料を使用して、ほぼ全面にこの樹脂を塗布し、フォトリソグラフィ手法により、各電極上の絶縁層を除去して電極が露出するように孔を開けるなどのフォトリソグラフィで容易に必要な絶縁層が形成でき、生産を容易にすることができるし、絶縁不良の確率を小さくできるので好ましい。

【0022】さらにまた、前記本発明の一体化複合電極においては、複数個の電極中心部が、 8×8 の格子上の各交点に位置することにより、前記本発明の電極からリード線を略放射状に配設できる最高の電極数とすることができるので好ましい。

【0023】

【実施例】本発明に供される絶縁基盤材料としては、細胞培養後顕微鏡観察するため透明な基盤が好ましく、石英ガラス、鉛ガラス、ホウ珪酸ガラス等のガラス、もしくは石英等の無機物質、または、ポリメタクリル酸メチルまたはその共重合体、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリプロピレン、尿素樹脂、メラミン樹脂などの透明性を有する有機物質等が挙げられるが、機械的強度と透明性を加味すると無機物質が好ましい。

【0024】本発明に供される電極材料としては、例えば酸化インジウム錫（ITO）、酸化錫、Cr、Au、Cu、Ni、Al等が使用可能である。特に、ITOもしくは酸化錫を用いると、電極は僅かに黄味を帯びた透明なものとなり、神経細胞の顕微鏡下での視認性がよく、実験操作上有利であるが、とりわけITOが良導伝性であるため望ましい。

【0025】リード線材料にも同様の材料が適用でき、

やはり電極材料と同様の理由でITOが好ましい。特に限定するものではないが、通常これらの電極やリード線の厚みは、約500~5000オングストローム程度であり、通常これらの材料を絶縁基盤上に蒸着し、フォトリソを用いてエッチングにより所望のパターンに形成できる。

【0026】また、本発明に供されるリード線を絶縁するための絶縁層材料としては、例えばポリイミド(PI)樹脂、エポキシ樹脂、アクリレート樹脂、ポリエステル樹脂、またはポリアミド樹脂等の透明な樹脂が挙げられる。

【0027】これらの樹脂は、リード線に通常の手法によって塗布して絶縁層が構成される。なお、絶縁層材料が光重合性等の感光性樹脂であると、前述したように電極を露出させるために電極上の絶縁層部分に孔を開けるなどのパターン形成が可能となるため好ましい。

【0028】特に、絶縁層材料がPIであり、培養する細胞が神経細胞である場合には、良好な生育を示すため望ましい。さらにPIの中でも、ネガティブフォトリソシティブポリイミド(NPI)が、配線部のパターン形成と同様に、略全面にネガティブフォトリソシティブポリイミドを塗布した後フォトリソエッチングプロセスを用いて電極状に孔を形成できるため好ましい。

【0029】また、絶縁層の厚みは絶縁性が付与できる程度であればよく、特に限定するものではないが、通常0.1~10μmが好ましく、1~5μmがさらに好ましい。

【0030】本発明の一体化複合電極を用いて、直接細胞を培養して細胞の電気活動を計測記録した。培養条件もしくは細胞の種類によって、細胞体の大きさもしくは樹状突起や軸索などの細胞突起の長さが異なるが、一体化複合電極の最近接の電極間距離は、10~1000μmが好ましい。電極間距離が10μm未満であると、互いに近接し過ぎるため細胞体が細胞突起を介して相隣合う確率が減り、またリード線の配線も困難となる。また、1000μmを越えると、リード線の配線はしやすいが、細胞突起が1000μm程度も伸びることは稀なため、細胞体が電極上に位置する確率が減る。一般の条件でも、培養した細胞の細胞突起の長さは、哺乳動物の中枢神経細胞の場合、平均200~300μm程度であるため、電極間距離は200~300μm程度が望ましい。

【0031】電極面積については、長期にわたり細胞に電気刺激を印加する際の電極破壊を避けるため、培養液との界面での抵抗を小さくする必要があるため、ある程度以上の大きさが要求される。しかしながら、電極面積が大きくなり培養液との界面での抵抗が小さくなると、測定される細胞の電気的活動は小さくなり、S/N比が低下する。すなわち、電流値Iが一定とすると、 $I = V/R$ であるから、抵抗値Rが小さくなると測定される電

位Vの変化も小さくなる。つまり測定される細胞の電気的活動が小さくなりS/N比が低下する。このため、電極面積は慎重に調整される必要があり、円形状の電極の場合、直径が20μmより大きく200μm以下、特に100μm~200μmが好ましい。

【0032】また、電極部分の表面抵抗を $10\Omega/\text{cm}^2$ 以下にするため、ITO上面に金属をコートした。コート材料としては、Ag, Al, Bi, Au, Cu, Cr, Pt, Co等が使用可能であるが、神経細胞に対する毒性の低さを考慮すれば、Au, Ptの使用が望ましい。コートの厚みは、特に限定されるものではないが、約500オングストローム程度であり、通常これらの材料を絶縁基盤上に蒸着し、フォトリソを用いてエッチングにより所望のパターンに形成できる。

【0033】さらに、本発明の前述した好ましい態様によれば、一体化複合電極の絶縁層中の孔は、一体化複合電極上で培養した細胞体に電気刺激を与えると同時に、隣合う細胞体から電気的活動を検知するため、電極を露出する目的で形成し、電極中心部に位置する。

【0034】また、電極から伸ばしたリード線を放射状に配設することにより、リード線間の容量成分がなくなり、ノイズが減少し測定精度が向上する。また、本発明の一体化複合電極の電極中心部が、同心円状もしくは8×8以下の格子状の各交点に位置する構成であると、リード線を放射状に配線でき、特に可能な限り多くの電極を構成し、多点同時刺激・記録を行うという観点からは、8×8の格子状の各交点に電極を設けることが望ましい。

【0035】以下具体的実施例で、本発明の一体化複合電極をさらに詳細に説明する。

実施例1

図1は絶縁基盤3上に電極1とリード線2を形成した本実施例の一体化複合電極の絶縁層のない状態の配線部のパターンを示した平面図である。図2は図1で示した部材の上に形成された絶縁層のみの平面図の一部切り欠き図である。図3は本実施例の一体化複合電極の一部の断面図である。以下これらの図面を参照しながら説明する。

【0036】まず、複合電極配線部の作製について述べる。一体化複合電極の絶縁基盤3は機械的強度の強い透明な絶縁素材として、50×50×1mmの硬質ガラス("IWAKI CODE 7740 GLASS" [岩城硝子(株)製]以下同じ)を用いた。

【0037】電極1およびリード線2の材料にITOを用い、前記硬質ガラスの絶縁基盤3上の全面に約1000オングストローム厚に蒸着し、その後洗浄した。次に、8×8の格子状の各交点(図2の5で示されたような位置)に各電極1の中心部が位置し、各電極の最近接の電極の中心間距離が等しく、しかもリード線2が放射状に伸びた形状の電極1およびリード線2のパターンに

なるように、フォトレジストを用いて露光し、純水50、塩酸50、硝酸1の体積比で混合した溶液中でITOをエッチングした後、フォトレジストを除去した。電極1の直径は60 μ m、リード線2の幅は30 μ m、電極中心間距離は300 μ mの配線部を形成した。

【0038】について、絶縁層4としてネガティブフォトセンシティブポリイミド（以下NPIと略す）を、乾燥後の厚みが1 μ mとなるようにスピンコートし、図2に示すように配線部の各電極の中心に1辺50 μ mの正方形の孔5ができるように、絶縁層パターンを露光形成した。さらに、各電極の露出部分（すなわち1辺50 μ mの正方形の内部）に、膜厚500 \AA のオングストロームとなるように金6を蒸着した。

【0039】リード線2の電極1と反対方向の端部近傍の部分の外部回路との接点は、金7およびニッケル8でコートし、耐久性を向上させた。なお、本実施例では電極1およびリード2の部分にITO、絶縁層にNPI、電極表面コート材に金を用いたが、用いる材料はこれらに限定されないことは既に述べた。

【0040】また、本発明の一体化複合電極を構成するためのプロセスは本実施例の方法に限定されない。

実施例2

次に、一体化複合電極上での神経細胞の培養について述べる。

【0041】実施例1のようにして構成した一体化複合電極上で、神経細胞としてラット大脳視覚皮質を培養した。以下、培養法について詳細に述べる。

(イ) 妊娠後16～18日を経過したSDラットの胎児の脳を摘出し、氷冷したハンクス平衡塩液（以下HBBSと略す）に浸す。

(ロ) 氷冷HBBS中の脳から視覚皮質を切り出し、イーグル最小必須培地（以下MEMと略す）液中に移す。

(ハ) MEM液中で、視覚皮質をできるだけ細かく、最大でも0.2mm角となるように切断する。

(ニ) 細かく切断した視覚皮質を遠沈管（遠心分離用試験管）に入れ、カルシウムおよびマグネシウムを含まないHBBS（以下CMF-HBBSと略す）で3回洗浄した後、適量の同液中に分散する。

(ホ) 上記(ニ)の遠沈管中に、トリプシンのCMF-HBBS溶液（0.25重量%）を加え、全量を倍にする。緩やかに攪拌しながら、37℃で15分から20分間恒温状態に保ち酵素反応を行わせた。

(ヘ) 牛胎児血清（FCS）10vol.%を含むダルベッコ変異イーグル培地（DMEM）とHamF-12培地を1対1の体積比で混合したDMEM/F-12混合培地を、上記(ホ)を経た遠沈管に加え、全量をさらに倍にする。先端をバーナーであぶり口径を小さくしたパスツールピペットで、緩やかにピペッティングを繰り返す（最大20回程度）、細胞をほぐす。

(ト) 9806.65m/sec²（すなわち1000

g）で約5分間遠心分離を行う。遠心分離終了後、上清を捨て、沈殿をFCS 5vol.%を含むDMEM/F-12混合培地に懸濁する。

(チ) 上記(ト)および(チ)をあと2回（計3回）繰り返す。

(リ) 最終的に得られた沈殿を、5vol.%FCSを含むDMEM/F-12混合培地に懸濁し、懸濁液中の細胞濃度を赤血球計数板を用いて計測する。同様の培地を用いて細胞濃度を2～4 $\times 10^6$ 個/mlになるように調整する。

(ヌ) 一体化複合電極上に直径25mm、高さ6mmのプラスチック製円筒を、複合電極の中心とプラスチック円筒の中心を合わせて接着することにより構成した細胞培養用ウェル中に、あらかじめ5vol.%FCSを含むDMEM/F-12混合培地500 μ lを加え、CO₂インキュベータ内（空気濃度95vol.%、CO₂濃度5vol.%、相対湿度97%、温度37℃）で暖めておく。

(ル) 上記(ヌ)のウェル中に、細胞濃度を調整した懸濁液100 μ lを静かに加え、再びCO₂インキュベータ内に静置する。

(ヲ) 上記(ル)の操作より3日後に、培地の半量を新しいものと交換する。交換培地はFCSを含まないDMEM/F-12混合培地を用いる。

(ワ) 以降、4～5日毎に上記と同様の培地交換をおこなう。

【0042】これら一連の操作により、一体化複合電極上でラット大脳視覚皮質の神経細胞を培養することができた。細胞は絶縁層（NPI）上でも白金黒を析出させた電極上でも良好に生育した。したがって、適当な位置にある電極を刺激電極または記録電極として用いれば、神経細胞電気活動の同時多点計測が可能であった。

【0043】また、本発明の一実施例の一体化複合電極の適当な位置にある電極を通じて100 μ Aの定電流刺激を1Hzの頻度で1週間にわたって与えた前後で、適当な位置にある電極で神経細胞の電氣的応答（電位変化）を記録した例を図4および図5に示す。図4は刺激前の神経細胞の電氣的応答の記録、図5は刺激後の神経細胞の電氣的応答の記録を示す。

【0044】さらに、図6および図7に電極表面を金でコートしていない一体化複合電極を用いて、上記と同様の条件で長期刺激を加えた前後での、神経細胞の電氣的応答を記録した例を示す。図6は刺激前の神経細胞の電氣的応答の記録、図7は刺激後の神経細胞の電氣的応答の記録を示す。

【0045】図4から図7において、矢印は刺激電流印加に伴い発生したアーチファクト、矢頭は神経細胞の電氣的活動により発生した電位変化を示す。図6から分かるように、電極表面を金でコートしていない一体化複合電極を用いた場合はアーチファクトの発生が大きいのに

対し、図4の本発明の一実施例の一体化複合電極を用いた場合では、アーチファクトの発生が抑えられている。

【0046】また、図7から分かるように、電極表面を金でコートしていない一体化複合電極を用いた場合はアーチファクトの発生が刺激前より大きく、神経細胞の電気的活動はアーチファクトに隠れ測定不可能となった。それに対し、図5の本発明の一実施例の一体化複合電極を用いた場合では、図4で示された場合と同様、アーチファクトの発生が抑えられており、神経細胞の電気的活動を十分に記録することができた。

【0047】なお、神経細胞の培養法は本実施例以外にも多くの変法があり、本実施例に限定されるものではない。

【0048】

【発明の効果】以上説明した通り、本発明の一体化複合電極は、神経細胞の培養が可能で、従来不可能または非常に困難であった神経細胞電気活動の同時多点計測および多細胞にわたる信号伝達の数時間以上の長期観察が実現でき、また、応答性の優れた一体化複合電極を提供できる。

【0049】また、最近接の電極間距離が、 $10\mu\text{m}$ 以上 $1000\mu\text{m}$ 以下の範囲であることにより、各細胞体が各電極上に位置し、かつ神経突起を介して結合する可能性が高くでき、神経細胞の測定に好都合な一体化複合電極とすることができる。

【0050】また、リード線をカバーする絶縁層が、各電極上に孔を有し、かつリード線の外部回路との接点近傍を除いて前記絶縁基盤のほぼ全面に設けられた絶縁層であることにより、感光性樹脂からなる絶縁材料を使用して、ほぼ全面にこの樹脂を塗布し、フォトリソグラフィ手法により、容易に必要な絶縁層パターンが形成でき、生産が容易で、絶縁不良の確率の小さい一体化複合電極とすることができる。

【0051】また、各電極部分の表面抵抗が低く、かつ細胞毒性の低い物質でコートされているため、適当な電極を用いて刺激電流を加え、他の適当な電極を用いて電位変化を記録する際に、長期にわたり刺激を加えた後でも電極の分極が少なく、安定した記録が可能な一体化複

合電極とすることができる。

【0052】また、複数個の電極中心部が、 8×8 の格子上の各交点に位置することにより、前記本発明の電極からリード線を略放射状に配設できる最高の電極数とすることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例の絶縁基盤上に電極とリード線を形成した本発明の一体化複合電極の絶縁層のない状態のパターンを示した平面図である。

10 【図2】本発明の一体化複合電極の一実施例の絶縁層のみの平面図の一部切り欠き図である。

【図3】本発明の一体化複合電極の一実施例の一部の断面図である。

【図4】本発明の一体化複合電極の一実施例において、適当な電極を用いて長期に刺激電流を印加する前に、他の適当な電極を用いて記録した電位変化波形図である。

【図5】本発明の一体化複合電極の一実施例において、適当な電極を用いて長期に刺激電流を印加した後に、他の適当な電極を用いて記録した電位変化波形図である。

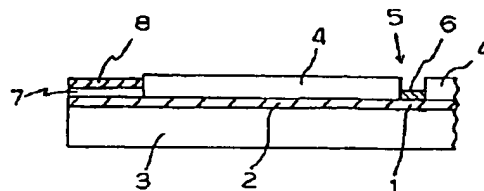
20 【図6】本発明の一体化複合電極の一実施例と電極表面を金でコートしていない点だけが異なる一体化複合電極を用いて、適当な電極を用いて長期に刺激電流を印加する前に、他の適当な電極を用いて記録した電位変化波形図である。

【図7】本発明の一体化複合電極の一実施例と電極表面を金でコートしていない点だけが異なる一体化複合電極を用いて、適当な電極を用いて長期に刺激電流を印加する前に、他の適当な電極を用いて記録した電位変化波形図である。

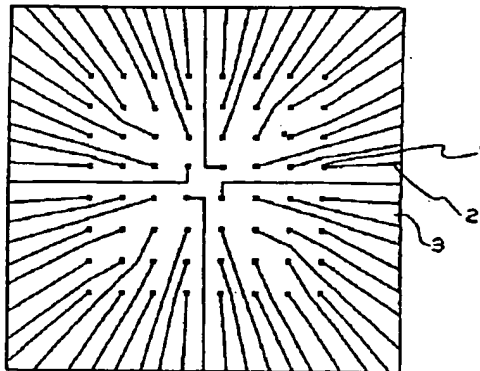
30 【符号の説明】

- 1 電極
- 2 リード線
- 3 絶縁基盤
- 4 絶縁層
- 5 孔
- 6 金
- 7 金
- 8 ニッケル

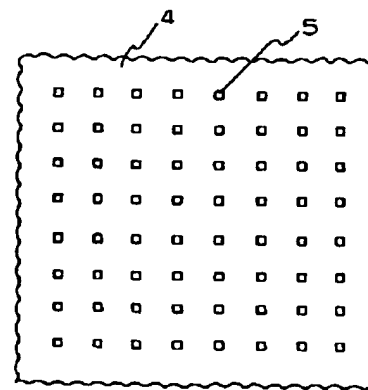
【図3】



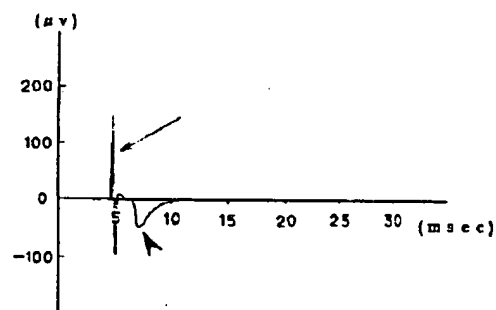
【図1】



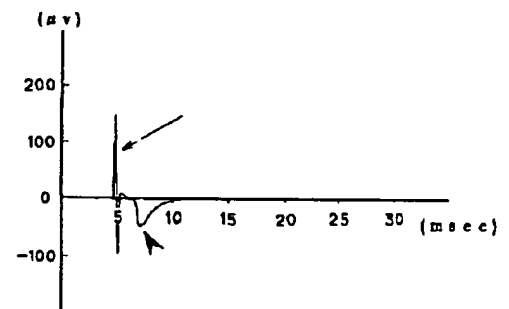
【図2】



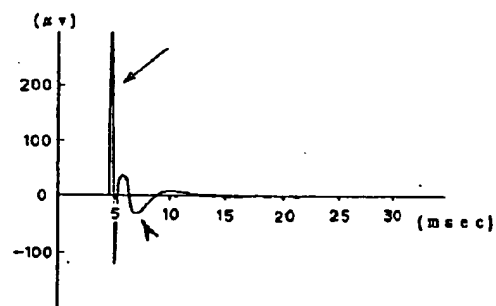
【図4】



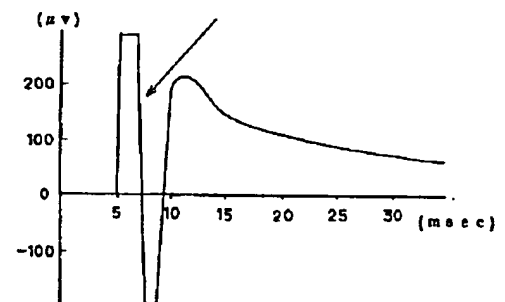
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

// H01B 5/14

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

Z

7638-4C

A 61 B 5/04

3 0 0 J